

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

KATEDRA GENETIKY, ŠLECHTĚNÍ A VÝŽIVY ZVÍŘAT

---

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**



**ANALÝZA VYBRANÝCH POLYMORFIZMŮ  
KURA DOMÁCÍHO**

HELENA TYLLEROVÁ

Vedoucí práce: doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Školitel specialista: Ing. Lenka Hanusová

České Budějovice, 2008

## ANOTACE

U vybraných linií šlechtitelského programu DOMINANT CZ - Rhode Island Red (RIR), New Hampshire (NH) a finálních hybridů RIRxNH a NHxRIR, byl zkoumán gen kuřecího růstového hormonu. Analýza PCR - RFLP odhalila tři *MspI* štěpná místa na intronu 1. Tato štěpná místa poskytovala fragmenty o délce 540 bp, 390 bp, 270 bp, 240 bp, 150 bp a 120 bp. Na základě restričních vzorů byly ve sledovaných populacích popsány tři alely genu růstového hormonu. Z možných šesti genotypů byly nalezeny pouze čtyři. V linii RIR je nejvíce zastoupena alela  $A_1$  s frekvencí výskytu 0,925, u NH převažuje alela  $A_3$  s frekvencí výskytu 0,550. U finálních hybridů RIRxNH a NHxRIR převažují kříženci s alelou  $A_1$ .

**Klíčová slova:** Polymorfismus, Růstový hormon, *MspI*, PCR-RFLP, Rhode Island Red (RIR), New Hampshire (NH).

## ANNOTATION

Chicken growth hormone gene was examined in chosen strains from DOMINANT CZ breeding program - Rhode Island Red (RIR), New Hampshire (NH) and the final hybrids RIRxNH and NHxRIR. Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analyses reveal three *MspI* restriction sites of intron 1 region. These restriction sites give rise to six RFLP fragments – 540 bp, 390 bp, 270 bp, 240 bp, 150 bp, 120 bp. Based on restriction patterns, three alleles of growth hormone were determined. From a possible six genotypes, only four were found in all populations. The allele  $A_1$  is the most abundant in RIR strain (0.925), allele  $A_3$  is the most abundant in NH strain (0.550). The allele  $A_1$  was present in the most of the hybrids.

**Key words:** Polymorphism, Growth hormone, *MspI*, PCR-RFLP, Rhode Island Red (RIR), New Hampshire (NH).

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji mému školiteli bakalářské práce doc. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc. za odborné vedení a především Ing. Lence Hanusové za cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Jakubu Karáskovi za pomoc při zpracování výsledných dat a psychickou podporu.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Analýza vybraných polymorfizmů kura domácího“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne ..... podpis diplomanta .....

## OBSAH

OBSAH .....	- 1 -
1 ÚVOD .....	- 2 -
1.1 Kur domácí (Gallus domesticus) .....	- 2 -
1.2 Růstový hormon .....	- 2 -
1.2.1 Růstový hormon kura domácího (Gallus domesticus).....	- 3 -
1.3 Genetický polymorfismus .....	- 3 -
1.3.1 Genetický polymorfismus růstového hormonu kura domácího (Gallus domesticus)..	- 4 -
1.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	- 5 -
1.4.1.1 Primery .....	- 6 -
1.4.2 Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (PCR - RFLP) .....	- 6 -
1.4.3 Elektroforéza.....	- 7 -
2 MATERIÁL A METODIKA .....	- 8 -
2.1 Analyzované linie nosného typu slepic .....	- 8 -
2.1.1 New Hampshire .....	- 8 -
2.1.2 Rhode Island Red .....	- 8 -
2.1.3 Hybridi RIR x NH a NH x RIR .....	- 9 -
2.2 Laboratorní metody.....	- 9 -
2.2.1 Odběr vzorků a izolace DNA.....	- 9 -
2.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	- 9 -
2.2.3 Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (PCR - RFLP).....	- 10 -
2.2.4. Statistická analýza.....	- 11 -
3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	- 12 -
3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	- 12 -
3.2. Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (PCR - RFLP) .....	- 12 -
3.2.1 Alely.....	- 12 -
3.2.2 Genotypy.....	- 13 -
3.3 Genotypové a alelové frekvence.....	- 16 -
3.3.1 ANOVA.....	- 18 -
4 ZÁVĚR .....	- 22 -
5 SEZNAM LITERATURY .....	- 23 -

# 1 ÚVOD

Cílem této práce je metodologicky zvládnout analýzu polymorfismu molekulárně analytickými postupy. Dále studium polymorfismu genu růstového hormonu u vybraných linií šlechtitelského programu DOMINANT CZ, a to linií Rhode Island Red (RIR), New Hampshire (NH) a finálních hybridů RIRxNH a NHxRIR, vyhodnocení četnosti alel a genotypů s cílem potencionálně stanovit jejich vztah k některým užitkovým vlastnostem.

## 1.1 Kur domácí (*Gallus domesticus*)

Z mnoha chovaných druhů drůbeže je právě kur domácí (*Gallus domesticus*) celosvětově nejpobulárnějším a nejpoužívanějším druhem. Jeho předností je možnost chovu jak pro maso, tak i pro vejce.

Za divokého předka kura domácího (*Gallus domesticus*) je považován kur bankivský (*Gallus gallus*) žijící v Indomalajské oblasti. Domestikace probíhala po dlouhé období. Zprvu byl kur šlechtěn pro vizuální zjev a kohoutí zápasy, teprve později byla objevena možnost využívat kura jako zdroj potravy v podobě masa a vajec (Moreng and Avens, 1985; Crawford, 1990). Vysoké užitkovosti dnešních plemen bylo dosaženo přísnou selekcí.

Kur bankivský (*Gallus gallus*) byl rovněž prvním ptákem, kterému byl přečten genom (Schmutz and Grimwood, 2004). Sekvence jeho genomu jsou veřejně dostupné v řadě databází.

## 1.2 Růstový hormon

Růstový hormon, polypeptidový hormon syntetizovaný a sekretovaný hypofýzou, se podílí na široké škále fyziologických parametrů jako kontrola chuti, tělesná stavba, stárnutí, reprodukce, růst tělesných tkání a ovlivňuje v organismu četné metabolické reakce (Byatt *et al.*, 1993; Apa *et al.*, 1994; Vasilatos-Younken 1995), stejně tak i imunitní odpověď (Marsh 1992; Blalock 1994; Kelley and Celtem 1995). Bylo prokázáno, že za poruchy jako dwarfismus nebo akromegalie jsou zodpovědné genetické varianty těchto genů (Goddart *et al.*, 1995), indikující přítomnost mutací s velkým fenotypovým efektem.

Použitím techniky PCR-RFLP může být charakterizována přítomnost genetických variant růstového hormonu a může být studován vztah takovéto alely s vlastnostmi ekonomického významu. Znalost polymorfismu může být dále užitečná ve fylogenetické analýze, stejně jako v designu šlechtitelských programů (Thakur *et al.*, 2006).

Genomická struktura genu růstového hormonu byla studována u různých zvířat (krysa, skot, ovce, prase, člověk, koza, kur a myš).

### 1.2.1 Růstový hormon kura domácího (*Gallus domesticus*)

Gen kuřecího růstového hormonu se sestává z pěti exonů a čtyř intronů, podobně jako savčí gen růstového hormonu. Nicméně velikost genu kuřecího růstového hormonu je průkazně větší, než analog savčího genu, protože jeho introny jsou mnohem rozsáhlejší, až 3,5 kbp (Tanaka, 1992).

V novější práci Moua (1994) byl v *MspI* místě intronu 1 nalezen v pozici + 308 nukleotidu fragment o délce 196 bp. Tento fragment nebyl obsažen v sekvenci publikované Tanakou (1992). Tato absence mohla být způsobena delecí u kmene použitého k jeho studii. Nicméně tento fragment je přítomen u ostatních komerčních kmenů (Mou, 1994).

Gen receptoru kuřecího růstového hormonu je lokalizován na Z chromosomu. Faktor 1 růstového hormonu je lokalizován ve špičce dlouhého ramena chromosomu 1 (Feng, 1997).

Samotný gen kuřecího růstového hormonu se nalézá na 27. chromosomu (Obr. 1) a je přibližně 4 kb dlouhý, což odpovídá genetické vzdálenosti  $10^{-2}$  cM. Z tohoto důvodu jsou rekombinantní události vzácné (Kuhnlein *et al.*, 1997).



**Obr. 1:** Pozice genu růstového hormonu na chromosomu 27.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=378781#refseq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=378781#refseq)

### 1.3 Genetický polymorfismus

Většina podrobně studovaných genů se v populacích vyskytuje v mnoha variantách, alelách, lišících se přinejmenším v přítomnosti bodových mutací. Mluvíme tedy o polymorfismu genů. Existence polymorfismů je pro druh často výhodná a mnohé druhy mají dokonce vytvořeny nejrůznější mechanismy zabráňující jeho ztrátě. Velká část polymorfismů je určena geneticky, a je

tedy v různé míře dědičná. Teprve metody molekulární genetiky umožnily detekovat a studovat polymorfní geny. Bylo zjištěno, že většina alel se liší pouze v jednom nukleotidu. V některých případech změna nukleotidu nemusí vyvolat změnu příslušné aminokyseliny, a tím i změnu bílkoviny. Avšak v některých případech dochází na základě bodové mutace ke změně proteinů (Flégr, 2005).

### **1.3.1 Genetický polymorfismus růstového hormonu kura domácího (*Gallus domesticus*)**

Studie na masných typech kuřat s použitím metody RFLP ukázaly, že gen růstového hormonu je v oblasti intronů vysoce polymorfní. Jednotlivé alely jsou spojené se selekcí na obsah břišního tuku. U kuřat selektovaných pro tučnost byl pozorován jednoduchý *MspI* polymorfismus, avšak u kuřat šlechtěných na libové maso byl pozorován polymorfismus mnohonásobný. Restrikční vzory poskytované těmito polymorfismy se navzájem lišily, v prvním případě docházelo ke vzniku fragmentu o 2,0 kbp, v druhém případě se vyskytovaly dva fragmenty o délkách 1,1 kbp a 0,9 kbp (Fotouhi, 1993).

Další práce analyzovala 12 neinbredních kmenů bílých leghornek pomocí metody PCR-RFLP ve třech *MspI* místech (PM1, PM2 a PM3) a jednom *SacI* místě (PS1). Tato místa byla lokalizována v intronu 1 (PM3), intronu 3 (PM2) a intronu 4 (PM1, PS1). Na základě analýzy vazebné nerovnováhy bylo objeveno osm různých alel (tj. kombinací RFLP). Pět z nich se objevovalo s frekvencí vyšší než 5 % nejméně u jednoho z kmenů. Tyto alely, nacházející se uvnitř intronů, byly selektovány buď pro sadu vlastností vaječné produkce, rezistence k Markově chorobě nebo aviární leukóze (Kuhnlein *et al.*, 1997). Selektce na rezistenci k chorobám byla nepřímo úměrně korelována s nárůstem frekvence jedné alely. V jednom kmeni se nacházely pouze dvě alely, které se lišily ve třech RFLP. Analýza variance v tomto kmeni indikovala, že alela růstového hormonu selektována s rezistencí byla spojena s oddálením začátku ovulace, ale i s delším trváním ovulace s pokročením věku, vyústující v celkový vzrůst vaječné produkce o 15 % (věk od prvního vejce do 497 dní). Alela růstového hormonu spojená s rezistencí byla dominantní pro začátek ovulace a recesivní pro vytrvalost vaječné produkce. Genotyp růstového hormonu neměl žádný signifikantní efekt na juvenilní tělesnou hmotnost, vaječnou produkci nebo hmotnost vajec (Kuhnlein *et al.*, 1997).

V intronu 4 genu růstového hormonu u čínských domorodých kuřat byla objevena alela, která je charakterizovaná delecí 50 bp z pozice 421-470. Tato alela způsobuje zmenšení PCR

produktu, ale současně v 510 nt zformovala nové *MspI* místo, dávající fragment o 460 bp (Nie, 2002).

Polymorfismus genu růstového hormonu byl také pozorován u ostatních druhů drůbeže a živočichů. Současná studie mléčného skotu ukázala, že polymorfismus *MspI* intronu 3 bovinního růstového hormonu byl spojen s obsahem mléčného proteinu. Studie umělé inseminace u býků odhalila, že polymorfismus genu růstového hormonu je také spojený s reprodukční vytrvalostí býků (Ip, 2000).

### 1.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Nejpoužívanější metoda pro amplifikaci studovaných genů je polymerázová řetězová reakce (PCR), která byla poprvé použita koncem roku 1983 Kary Mullisem. Jedná se o citlivou metodu sloužící k získání obrovského množství kopií vzorku DNA. Namnožená DNA pak slouží pro navazující analýzy.

Typické složení reakční směsi pro PCR obsahuje DNA templát, směs čtyř nukleotidů dNTP's, dvojici primerů, *Taq* polymerázu, komerčně dodávaný pufr,  $MgCl_2$  a kvalitní redestilovanou vodu.

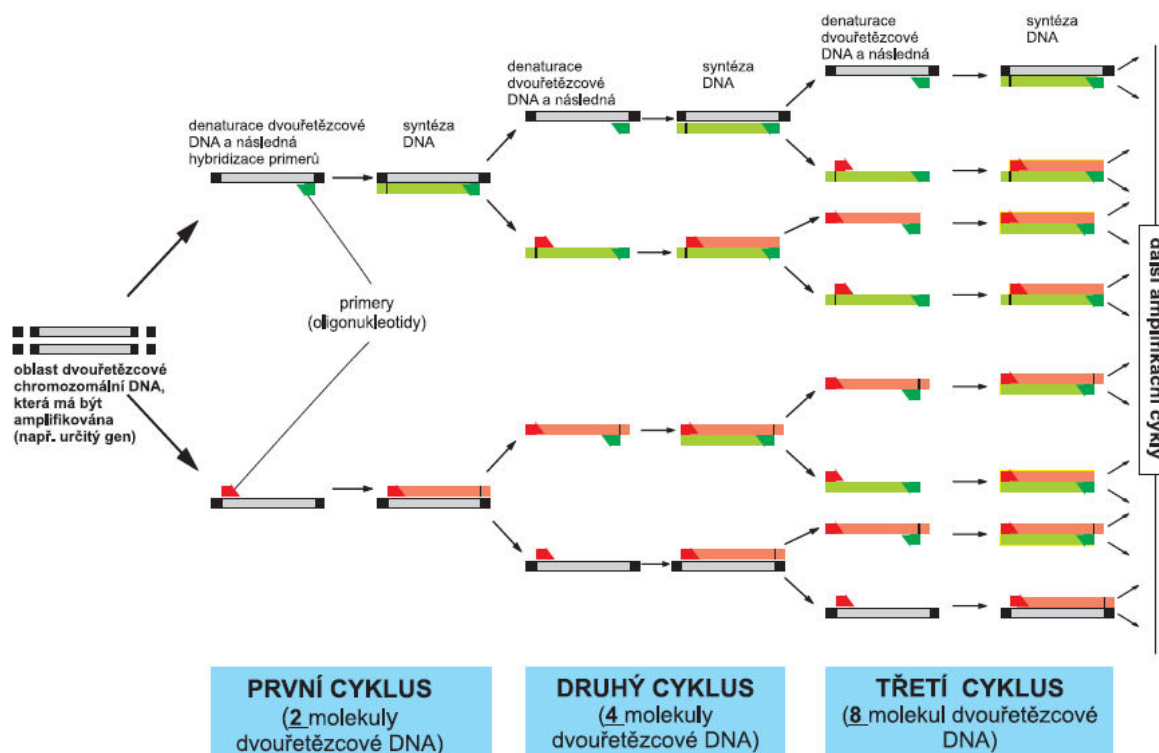
PCR je založena na syntéze komplementárního vlákna s využitím předem definovaných primerů. Dochází ke geometrické amplifikaci molekul DNA za cyklického opakování tří kroků, lišících se pouze teplotními podmínkami (Obr. 2).

Denaturace: Reakční směs se zahřeje na teplotu 92-95°C, dochází k disociaci fragmentů dsDNA (double-strand DNA) na jednotlivé řetězce.

Annealing: Reakční směs je ochlazená a dochází k navázání primerů. Tento krok je z celého procesu nejdůležitější, protože na správném navázání primerů závisí úspěch celé PCR. Teplota se zpravidla liší v závislosti na délce a dalších vlastnostech primerů. Obvykle se pohybuje mezi 45 a 60°C.

Extenze: Dochází k vlastní syntéze nových řetězců, navazujících na 3'- konce primerů. Tato reakce je katalyzována *Taq* polymerázou při teplotě 72°C. Při této teplotě jsou volné nukleotidy začleňovány do vznikajícího řetězce přibližně rychlostí 35 bází za sekundu. Délka trvání této fáze závisí na délce syntetizovaného fragmentu (Zima *et al.*, 2004).





**Obr. 2:** Princip průběhu PCR.

<http://www.otvorena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf>

### 1.4.1.1 Primery

Primery jsou dva oligonukleotidy, z nichž každý je komplementární k sekvenci jednoho řetězce dvouřetězcové DNA na opačných koncích úseku DNA, který má být amplifikován. Primery slouží k syntéze DNA pomocí enzymu DNA polymerázy a ohraničují amplifikovaný segment. Správná volba primerů je jedním z nejdůležitějších předpokladů úspěšné PCR (Hartl, 2000).

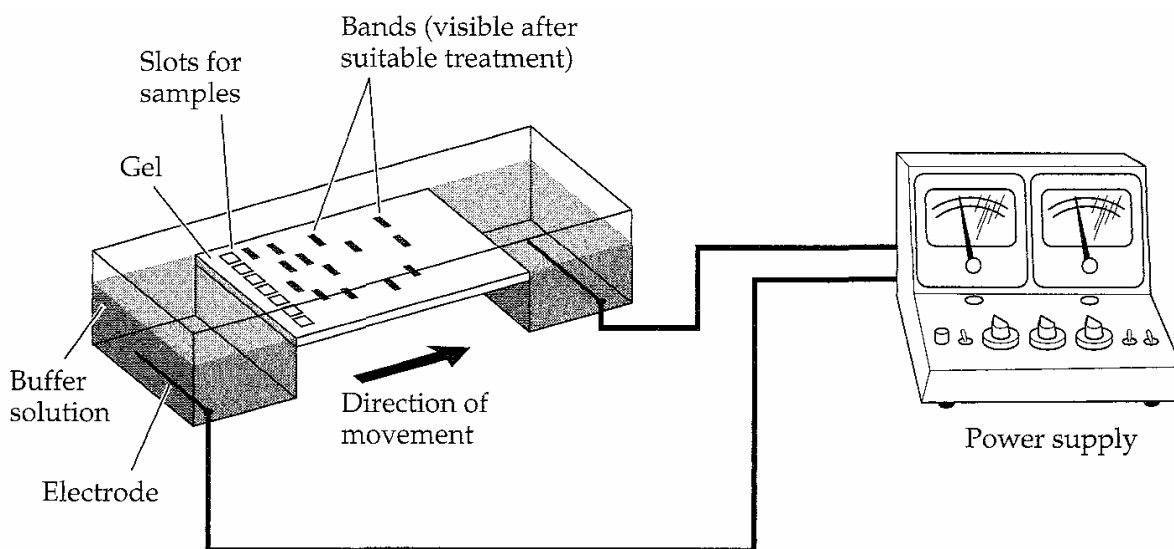
### 1.4.2 Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (PCR - RFLP)

Restrikční analýza DNA je metodou charakterizace DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleázami na fragmenty (Botstein *et al.*, 1980). K DNA produktu získaného pomocí PCR přidáme vybrané restrikční endonukleázy. Je známo velké množství bakteriálních restrikčních endonukleáz, které se liší od sebe tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů 4 – 8 bp.

V rozpoznávaném úseku DNA dochází ke štěpení řetězce DNA. Výsledkem jsou různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bází zkoumané DNA. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením (Hartl, 2000).

### 1.4.3 Elektroforéza

Elektroforéza je separace nabitých molekul v elektrickém poli (Obr. 3). Velikostně rozdílné fragmenty DNA se pohybují v elektrickém poli různou rychlostí. Každý vzorek DNA je umístěn do malého slotu poblíž okraje obdélníkového agarózového gelu. Gelem se ponechá po dobu několika hodin procházet elektrický proud. Fragmenty DNA se pohybují gelem v reakci na elektrické pole. Každý fragment urazí celkovou vzdálenost rovnající se logaritmu jeho velikosti. Pokud vzorek obsahuje omezené množství velikostí fragmentů DNA, pozorováním gelu pod UV (díky přidání speciálního barviva vázajícího se na DNA a emitujícího při osvětlení UV světlem) lze určit pozici každého fragmentu dle jeho velikosti, kde koncentrace každého fragmentu produkuje jasný fluorescentní proužek gelu (Hartl, 2000).



**Obr. 3:** Aparatura elektroforézy (Hartl, 2000).

## **2 MATERIÁL A METODIKA**

Živý materiál pro tuto studii byl poskytnut společností Líheň Studenec s.r.o. se sídlem ve Studenci v okrese Třebíč. Tato společnost od roku 1998 realizuje šlechtitelský program nosného typu slepic DOMINANT CZ.

### **2.1 Analyzované linie nosného typu slepic**

Linie nosného typu slepic se současným označením DOMINANT CZ je možné zařadit do kategorie středně těžkých plemen drůbeže. Na vytvoření převážně syntetických linií se podílely zejména komerčně uplatňované linie Rhode Island Red, Barred Plymouth Rock, Sussex a Leghorn. Novinkou v programu je těžší čistá původní populace New Hampshire, získaná v roce 2004 z Polska.

#### **2.1.1 New Hampshire**

Jedná se o populaci New Hampshire, testovanou pro uplatnitelnost v novém hybridizačním programu s cílem zvýšení tělesné hmotnosti finálních nosnic při zachování ostatních parametrů užitkovosti. Současně bude tato populace využita pro obohacení genového fondu, navýšení robustnosti a životnosti původních nosných populací programu DOMINANT CZ. Populace byla získána z Polska, kde byla známa a využívána od roku 1975 převážně pro extenzivní chov nosných programů a programů s kombinovanou užitkovostí. Významnou vlastností je geneticky kontrolovaná přítomnost alely "s" (zlatý faktor) pro colorsexing. Cílem je zušlechtit tuto populaci a ověřit její využitelnost v programech s vyšší hmotností těla a robustnějším rámcem. (Interní materiál firmy, nepublikováno).

#### **2.1.2 Rhode Island Red**

Rhode Island Red je jednou ze základních populací šlechtitelského programu DOMINANT CZ, zušlechtěvanou ve dvou základních subpopulacích lišících se rychlým (kk,k-) opeřením (otcovská populace v programech D 102, D 192, D 109) a pomalým opeřením (KK,K-) využívanou v programech D 959 a D 843 v mateřské pozici. Většina těchto programů D 102, D 192, D 109 a D 959 je žádaná a exportovaná do více než 20 zemí světa, a to jak na úrovni finálních hybridů, tak i rodičů a prarodičů. Další významnou vlastností je geneticky kontrolovaná přítomnost alely "s" (zlatý/stříbrný faktor) pro colorsexing. Hlavní významnou vlastností populace RIR 523 je

adaptabilita do extenzivních podmínek získaná selekcí při každoročně se měnícím složení krmné směsi a testováním v různých podmínkách prostředí (Interní materiál firmy, nepublikováno).

### **2.1.3 Hybridi RIR x NH a NH x RIR**

Hybridi (RIR♂xNH♀) a (NH♂xRIR♀) jsou kříženci první filiální generace mezi dvěma výchozími rodičovskými populacemi (RIR a NH). V našem případě jde o uplatnění kříženců v tvorbě syntetické nové populace a testování účinků křížení na užitkové parametry sledovaných znaků.

## **2.2 Laboratorní metody**

### **2.2.1 Odběr vzorků a izolace DNA**

Z obou linií a jejich vzájemných kříženců byla od každého pohlaví vybrána skupina 10 jedinců. Celkem bylo analyzováno 80 jedinců. Z křídelní žíly byly do zkumavek obsahující roztok EDTA odebrány 2 ml krve. Izolace genomové DNA z krve proběhla pomocí kitu NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel), kdy se postupovalo podle instrukcí výrobce. Výsledek izolace byl kontrolován pomocí elektroforézy na agarózovém 1,5% gelu s příměsí barviva ethidium-bromid, které se váže na DNA a pod UV lampou svítí.

### **2.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Po ověření kvality izolace byla s použitím primerů pro gen růstového hormonu kuřat CHG1-R a CHG1-F provedena PCR na termocykleru firmy Biometra. Po předehtání na 94°C po dobu 2 minut následovalo 30 cyklů skládajících se z: 95°C 30s, 60°C 30 s a 72°C 30 s. Vzorek PCR byl následně udržován po dobu 5 minut při 72°C. K vyhodnocení byla provedeno elektroforéza na 2,5% agarózovém gelu, barveném ethidium-bromidem.

**Tab. 1:** Složení reakční směsi pro PCR

	pro 1 reakci (v $\mu$ l)	pro 10 reakcí (v $\mu$ l)
Pufr	2	20
dNTPs	2	20
MgCl <sub>2</sub>	1,2	12
CHG1-R primer	1	10
CHG1-F primer	1	10
<i>Taq</i> polymeráza	2	-
DNA	1,3	-
H <sub>2</sub> O	9,5	95
Celkem	20	-

### **Kuřecí růstový hormon - primery**

Analýza pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byla vyvinuta pro RFLPs v intronu 1 pro *MspI* štěpná místa.

Primer 1 forward 5' ATC CCC AGG CAA ACA TCC TC 3'

Primer 2 reverse 5' CCT CGA CAT CCA GCT CAC AT 3'

### **2.2.3 Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restričních fragmentů (PCR - RFLP)**

PCR-produkt (4  $\mu$ l) byl štěpen přes noc při 37°C v reakční směsi obsahující 1  $\mu$ l *MspI*, 1,7  $\mu$ l reakčního bufferu a vodu k získání konečného objemu 14  $\mu$ l. Fragments DNA byly poté analyzovány v 2 % agarózovém gelu, po dobu 2 hod. při 80V. Fragments DNA byly barveny ethidium bromidem a fotografovány za použití UV transiluminátoru k vizualizaci produktu.

- restriční endonukleáza: *MspI*

- rozpoznávacím místem enzymu je: 5'-C↓CGG-3'

3'-GG↓CC-5'

- izoschizomer: *HpaII*

#### 2.2.4. Statistická analýza

Výpočet alelových a genotypových frekvencí byl proveden podle následujících vzorců:

$$f_{An} = \frac{n_{An}}{N}$$

kde:  $f_{An}$  je frekvence Alely n;  $n_{An}$  je počet pozorování alely  $A_n$ ; a N je celkový počet pozorování všech alel

$$f_{Gn} = \frac{n_{Gn}}{N}$$

kde:  $f_{Gn}$  je frekvence genotypu n;  $n_{Gn}$  je počet pozorování genotypu  $G_n$ ; a N je celkový počet pozorování všech genotypů.

U všech linií bylo ověřeno, zda se dané populace nacházejí v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Hardy-Weinbergova rovnice:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Zobecnění Hardy-Weinbergova principu pro případy mnohonásobného alelismu:

- frekvence výskytu alel:  $p + q + r = 1$
- frekvence výskytu genotypu:  $p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$

Ke zjištění vztahů mezi genotypy jednotlivých linií a produkčními vlastnostmi, jako snáška, hmotnost vajec, byla použita analýza variance (ANOVA).

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí použitého páru primerů byl získán výsledný produkt PCR o délce přibližně 780bp. Tato délka je v souladu s výsledky prací Ip *et al.* (2000) a Thakur *et al.* (2006). Kuhnlein *et al.* (1997) uvádí délku 756 bp. Rozdíly v délkách výsledných produktů mohou být vysvětleny delecí nebo inzercí či duplikací sekvence, což může být potvrzeno pouze sekvenací.

#### 3.2. Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restričních fragmentů (PCR - RFLP)

##### 3.2.1 Alely

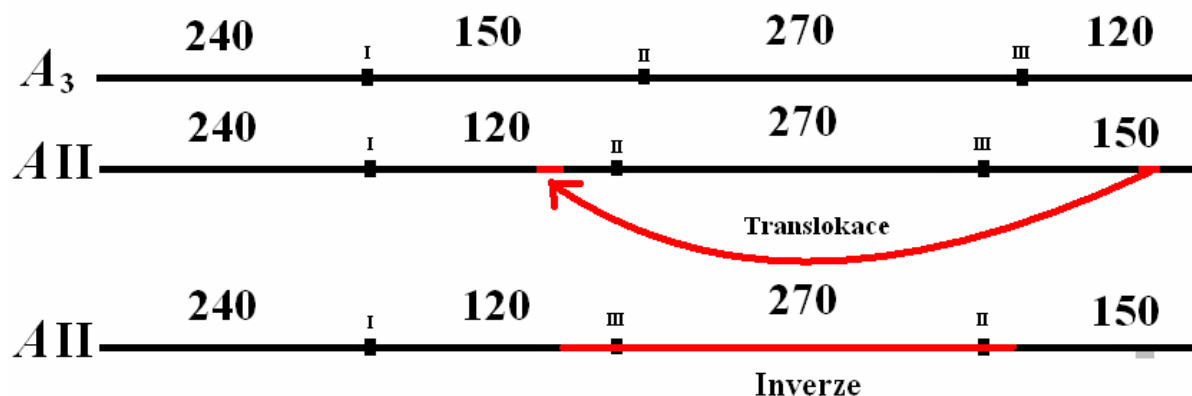
Analýzou PCR - RFLP intronu 1 enzymem *MspI* byly odhaleny fragmenty o následujících délkách 540 bp, 390 bp, 270 bp, 240 bp, 150 bp a 120 bp. Následné kombinace délek fragmentů předpokládá přítomnost tří restričních míst v pozicích I. 240 nt, II. 390 nt a III. 660 nt. Kombinací těchto štěpných míst a jimi poskytovaných fragmentů byly ze všech možných kombinací při srovnání s nalezenými restričními vzory stanoveny tři alely genu růstového hormonu (Obr. 4). Alela  $A_1$  je charakterizována přítomností restričního místa I., poskytujícího fragmenty o délkách 540 bp a 240 bp. Alela  $A_2$  je charakterizována přítomností restričního místa II., poskytujícího dva fragmenty o shodné délce 390 bp, a alela  $A_3$  je charakterizována přítomností restričních míst I., II., III. poskytujících fragmenty o délkách 270 bp, 240 bp, 150 bp a 120 bp.



Obr. 4: Tři alely intronu 1 genu růstového hormonu.

Byly nalezeny dvě nové, dosud nepopsané alely  $A_2$  a  $A_3$  intronu 1 kuřecího růstového hormonu. Zároveň byla popsána dvě nová restriční místa, a to v 390 nt a 660 nt, avšak tuto skutečnost zbývá potvrdit osekvenováním.

Alela  $A_1$  je shodná s výslednou alelou  $A_1$  práce Thakur *et al.* (2006) a s alelou III práce Ip *et al.* (2000). Délky fragmentů alely  $A_3$  jsou shodné s výslednými délkami fragmentů u alely II v práci Ip *et al.* (2000) avšak pozice jednotlivých štěpných míst se liší. Je pravděpodobné, že došlo k mutaci jež vyústila v posunutí štěpných míst. První možností jak tento posun vysvětlit je translokace 30 bp úseku z koncové části intronu do pozice mezi 240 nt a 350 nt. Druhou, méně pravděpodobnější možností je inverze, vyústující ve změnu pořadí a pozice štěpných míst (Obr. 5). Tyto domněnky lze potvrdit nebo vyvrátit pouze sekvenací.

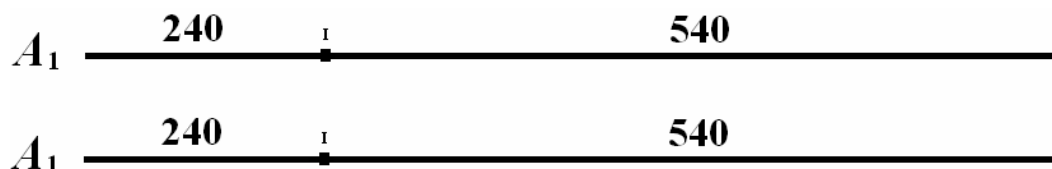


Obr. 5: Možný posun restričních míst II. a III, vyústující ve vznik alely  $A_3$ .

### 3.2.2 Genotypy

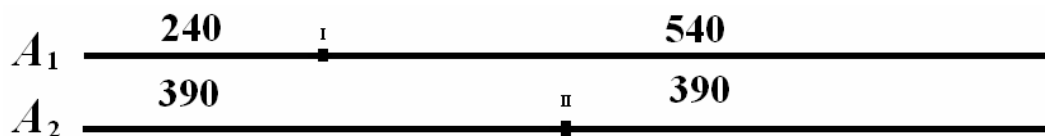
Při existenci tří různých alel je možný vznik šesti různých restričních vzorů, genotypů. Jedná se o následující genotypy:

1. Genotyp (vzor RFLP) - je tvořen homozygotně dvěma alelami  $A_1$ .

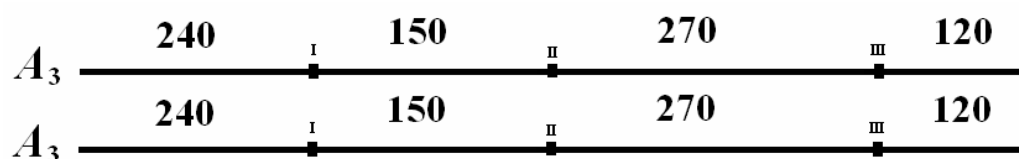




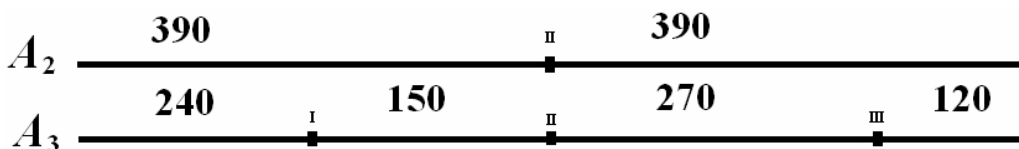
2. Genotyp - je tvořen alelami  $A_1$  a  $A_2$ .



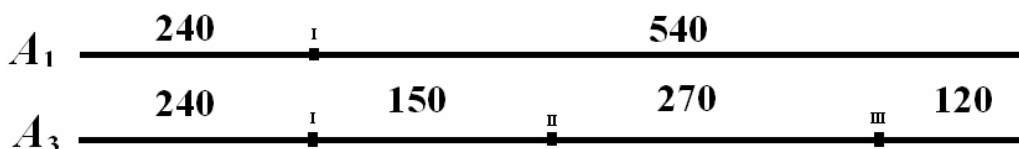
3 Genotyp - je tvořen dvěma alelami  $A_3$ .



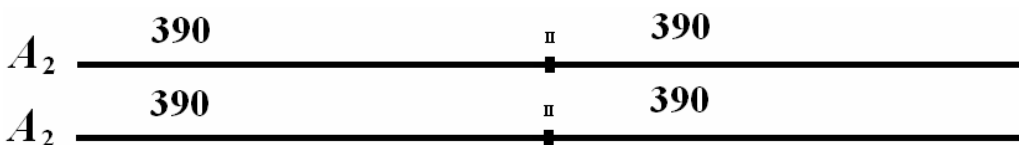
4. Genotyp - je tvořen alelami  $A_2$  a  $A_3$ .



5. Potencionální genotyp - tvořen alelami  $A_1$  a  $A_3$ .



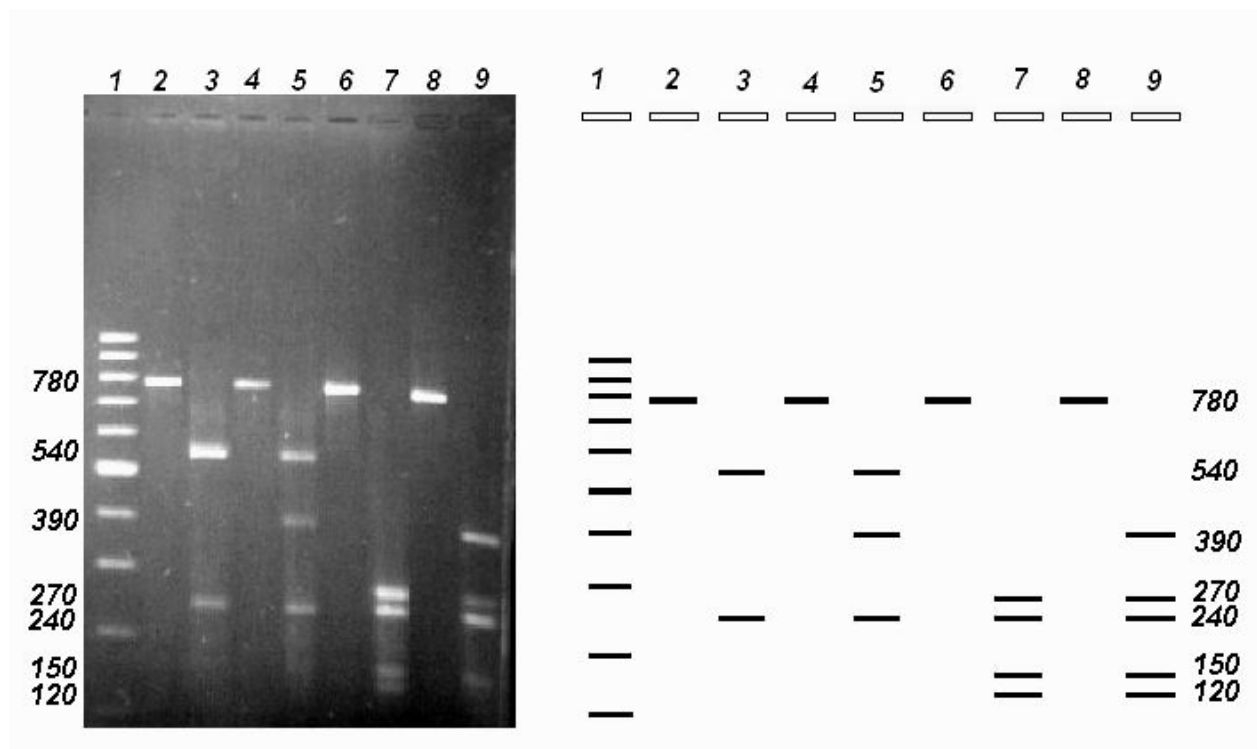
6. Potencionální genotyp - tvořen homozygotně dvěma alelami  $A_2$ .



V této studii se podařilo nalézt pouze čtyři možné genotypy:  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_3A_3$ ,  $A_2A_3$  (Obr. 6). Genotypy  $A_1A_3$ ,  $A_2A_2$  nebyly nalezeny, důvodem může být jejich vyřazení v důsledku nepřímé selekce, snížená životaschopnost jedinců s těmito genotypy nebo relativně malý počet zkoumaných vzorků.

Nalezené genotypy (restrikční vzory)  $A_1A_1$ ,  $A_3A_3$ ,  $A_2A_3$  se shodují se vzory popsány v práci Ip *et al.* (2000). Avšak alela  $A_3$  není pravděpodobně zcela totožná s definovanou alelou  $A_3$ , zřejmě v důsledku proběhlé mutace. Tito autoři dále popisují genotyp  $A_1A_3$ , který u jedinců analyzovaných v této práci nebyl nalezen, nicméně v citované práci byla jeho existence potvrzena.

Restrikční vzor  $A_2A_2$  není v literatuře popsán, přesto nelze jeho existenci vyloučit.



**Obr. 6:** Fotografie a grafické zobrazení gelu s jednotlivými restrikčními vzory (genotypy).

1 - Marker 100 bp.

3 – Genotyp (restrikční vzor)  $A_1A_1$  je charakterizována přítomností fragmentů o délkách 540 bp a 240 bp.

5 - Genotyp  $A_1A_2$  je charakterizována přítomností fragmentů o délkách 540 bp, 390 bp a 240 bp.

7 - Genotyp  $A_3A_3$  je charakterizována přítomností fragmentů o délkách 270 bp, 240 bp, 150 bp, 120 bp.

9 - Genotyp  $A_2A_3$  je charakterizována přítomností fragmentů o délkách 390 bp, 270 bp, 240 bp, 150 bp, 120 bp.

2, 4, 6, 8 – PCR.

### 3.3 Genotypové a alelové frekvence

Ze získaných výsledků byly pro všechny linie vypočteny frekvence genotypové (Tab. 3-6) a alelové (Tab. 2). Pozorovaná genotypová frekvence byla vypočtena z pozorovaných hodnot, genotypová frekvence očekávaná byla vypočtena pro ideální populaci (nacházející se v HW rovnováze) z vypočtených frekvencí alel.

**Tab. 2:** Frekvence výskytu alel u jednotlivých linií.

ALELA	RIR	NH	NHxRIR	RIRxNH
$A_1$	0,925	0,125	0,550	0,575
$A_2$	0,025	0,325	0,350	0,225
$A_3$	0,050	0,550	0,100	0,200

Linie RIR je dlouhodobě cíleně selektována pro užitkové vlastnosti, jako je snáška, hmotnost vajec, hmotnost těla, parametry reprodukce (líhivost, oplozenost), životaschopnost atd. Tento dlouhodobý proces vyústil ve vysokou frekvenci výskytu alely  $A_1$  (0,925) (Tab. 3). To poukazuje na možný vztah růstového hormonu k sledovaným selektovaným znakům.

Tato populace se nenachází v Hardy-Weinbergově rovnováze ( $\chi^2 = 100,073$ ) na hladině významnosti 0,01. To potvrzuje, že se jedná o linii, kde dochází k cílené selekci, která se v důsledku nepřímé selekce odráží v genotypových frekvencích.

**Tab. 3:** Genotypové frekvence u linie RIR.

GENOTYP	n	FREKVENCE POZOROVANÁ	FREKVENCE OČEKÁVANÁ
$A_1 A_1$	18	0,900	0,857
$A_1 A_2$	1	0,050	0,046
$A_3 A_3$	1	0,050	0,003
$A_2 A_3$	0	0	0,003
$A_2 A_2$	0	0	0,001
$A_1 A_3$	0	0	0,093

Linie NH je v porovnání s RIR selektována po výrazně kratší dobu. Selektace proběhla v populaci pouze v posledních dvou generacích, výchozí populace v Polsku byla pouze udržována bez individuální selekce. Převažuje zde alela  $A_3$  s frekvencí výskytu 0,550 následována alelou  $A_2$  s frekvencí 0,325 (Tab. 4). Alela  $A_1$ , která je dominantní u linie RIR, se zde vyskytuje s frekvencí pouze 0,125. Ani tato populace se nenachází v Hardy-Weinbergově rovnováze ( $\chi^2 = 43,374$ ).

**Tab. 4:** Genotypové frekvence u linie NH.

GENOTYP	n	FREKVENCE POZOROVANÁ	FREKVENCE OČEKÁVANÁ
$A_1 A_1$	1	0,050	0,015
$A_1 A_2$	3	0,150	0,081
$A_3 A_3$	6	0,300	0,303
$A_2 A_3$	10	0,500	0,357
$A_2 A_2$	0	0	0,106
$A_1 A_3$	0	0	0,137

U finálních hybridů RIRxNH a NHxRIR převažují kříženci s alelou  $A_1$  (genotypy  $A_1 A_1$ ,  $A_1 A_2$ ) (Tab. 5-6). Finální hybridy RIRxNH a NHxRIR jsou šlechtěni cíleně z rodičů s nejvyššími užitkovými vlastnostmi, lze tedy očekávat absenci některých genotypů. Ani jedna z linií hybridů se nenachází v Hardy-Weinbergově rovnováze ( $\chi^2$  RIRxNH = 115,  $p < 0,01$ ;  $\chi^2$  NHxRIR = 53,  $p < 0,01$ )

**Tab. 5:** Genotypové frekvence u RIR x NH hybridů.

GENOTYP	n	FREKVENCE POZOROVANÁ	FREKVENCE OČEKÁVANÁ
$A_1 A_1$	7	0,350	0,331
$A_1 A_2$	9	0,450	0,259
$A_3 A_3$	4	0,200	0,040
$A_2 A_3$	0	0	0,090
$A_2 A_2$	0	0	0,051
$A_1 A_3$	0	0	0,230

**Tab. 6:** Genotypové frekvence u NH x RIR hybridů.

GENOTYP	n	FREKVENCE POZOROVANÁ	FREKVENCE OČEKÁVANÁ
$A_1 A_1$	5	0,250	0,303
$A_1 A_2$	12	0,600	0,385
$A_3 A_3$	1	0,050	0,010
$A_2 A_3$	2	0,100	0,070
$A_2 A_2$	0	0	0,122
$A_1 A_3$	0	0	0,110

Překvapivě nebyl nalezen ani jeden jedinec s kombinací alel  $A_1 A_3$ , který by vznikl kombinací dvou dominujících alel v rodičovských liniích. Analyzovaný počet jedinců není dostatečný, proto nedošlo k nalezení všech možných kombinací alel. Je pravděpodobné, že při zvýšení počtu analyzovaných jedinců by byly nalezeny všechny genotypy.

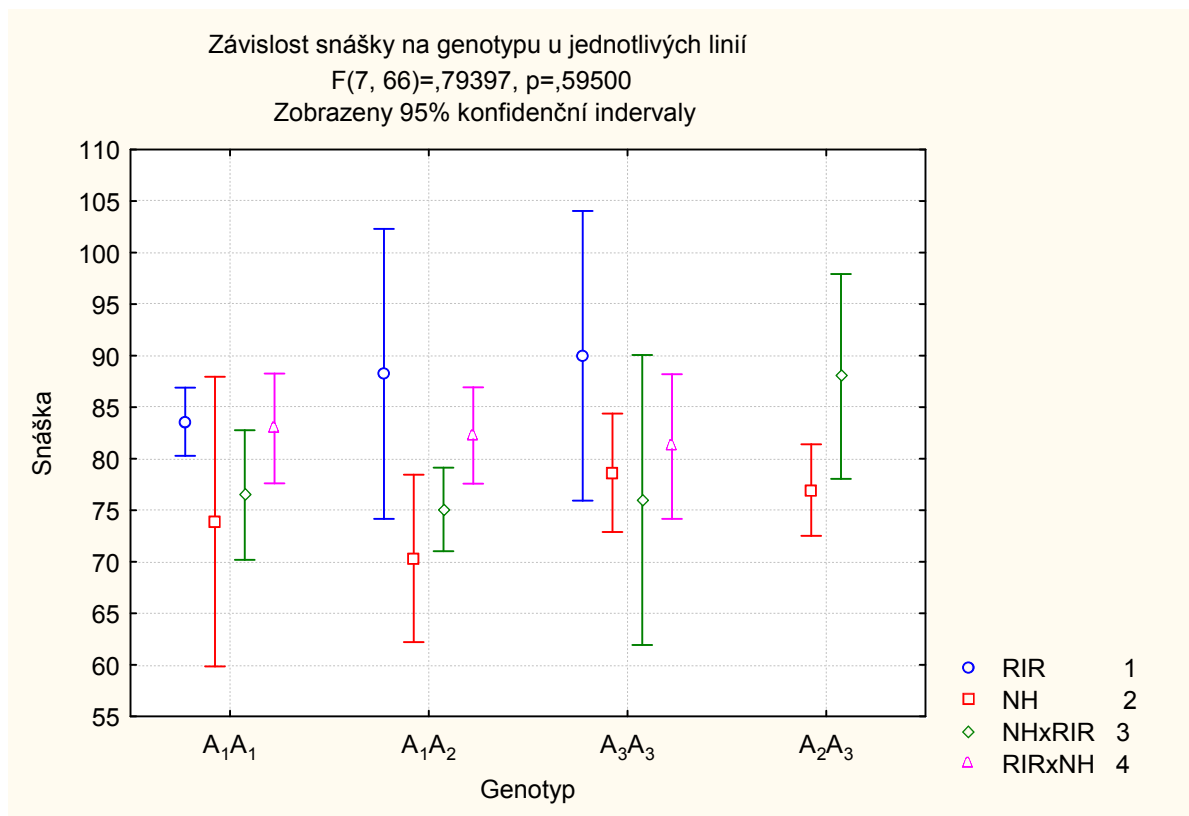
### 3.3.1 ANOVA

Byl analyzován vztah užitkových vlastností snáška a průměrná hmotnost vajec (Tab. 7) a jednotlivých genotypů a alel u obou výchozích linií a kříženců F1 generace. K vyhodnocení byla použita metoda dvoucestná ANOVA v programu STATISTIKA 6.0 (StatSoft). Mezi genotypy a alelami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v užitkovosti ( $F = 1,064$ ,  $p = 0,386$ )(Obr. 7-8). Veškerá zaznamenaná variabilita byla vázána na jednotlivé linie, mezi nimiž byl zjištěn statistický rozdíl ve snášce ( $F = 3,244$ ,  $p = 0,005$ ), avšak tento výsledek není překvapivý. Jednotlivé linie se mezi sebou liší stavbou a hmotností těla, což vede k rozdílům v počtu snesených vajec. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky práce Kuhnlein *et al.* (1997), kde také nebyl prokázán vliv jednotlivých alel růstového hormonu na dané vlastnosti užitkovosti.

**Tab. 7:** Užitekové vlastnosti u jednotlivých jedinců.

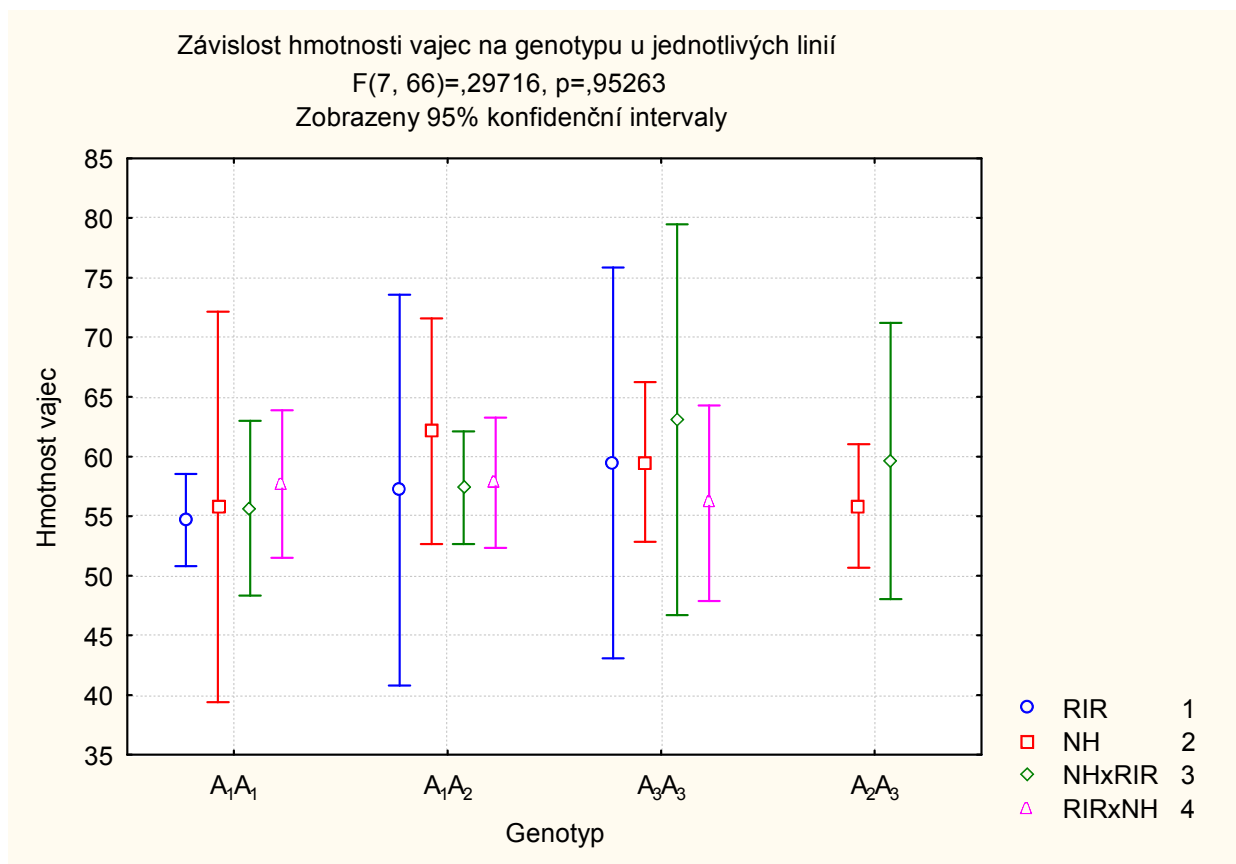
VZOREK	GENOTYP	SNÁŠKA	HMV	VZOREK	GENOTYP	SNÁŠKA*	HMV*
<b>RIR♀</b>				<b>RIR♂</b>			
1	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	73	62,110	41	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	73,395	55,655
2	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	83	53,510	42	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	85,005	54,585
3	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	92	59,460	43	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	82,915	55,595
4	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	85	61,440	44	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	84,915	55,660
5	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	87	58,140	45	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	81,385	57,990
6	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	94	53,510	46	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	87,870	57,045
7	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	96	58,140	47	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	88,250	57,195
8	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	64	58,000	48	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	86,410	58,845
9	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	90	59,460	49	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	80,000	58,005
10	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	84	68,050	50	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	85,000	56,500
<b>NH♀</b>				<b>NH♂</b>			
11	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	71	63,900	51	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	78,820	57,195
12	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	88	61,880	52	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	79,050	59,92
13	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	78	59,200	53	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	73,770	59,005
14	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	61	62,560	54	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	73,100	60,150
15	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	90	60,540	55	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	73,100	60,150
16	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	68	63,570	56	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	73,910	55,775
17	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	74	59,860	57	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	74,425	56,370
18	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	84	58,140	58	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	73,850	56,625
19	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	75	54,510	59	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	76,485	57,555
20	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	81	62,430	60	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	80,000	28,625
<b>NHxRIR♀</b>				<b>NHxRIR♂</b>			
21	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	69	57,430	61	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	77,435	57,350
22	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	72	57,710	62	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	78,000	55,500
23	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	85	53,840	63	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	77,395	56,380
24	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	77	59,150	64	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	77,000	55,000
25	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	75	56,100	65	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	78,260	55,000
26	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	76	57,960	66	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	77,395	56,380
27	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	89	60,020	67	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	77,540	55,280
28	<i>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub></i>	87	59,240	68	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	78,160	54,900
29	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	65	56,540	69	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	77,250	56,120
30	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	64	58,140	70	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	78,000	55,550
<b>RIRxNH♀</b>				<b>RIRxNH♂</b>			
31	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	103	59,030	71	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	80,000	59,000
32	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	85	56,490	72	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	78,645	56,735
33	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	73	59,790	73	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	83,170	57,375
34	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	95	58,230	74	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	79,070	56,675
35	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	92	55,160	75	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	84,205	58,485
36	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	85	53,510	76	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	77,715	59,145
37	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	85	53,510	77	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	75,520	55,680
38	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	76	56,730	78	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	82,705	56,985
39	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	73	58,270	79	<i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i>	83,550	57,385
40	<i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i>	74	57,770	80	<i>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub></i>	84,205	58,485

\* HMV – hmotnost vajec uprostřed snáškového cyklu. Hodnoty pro samce vypočteny z Animal modelu.



**Obr. 7:** Graf vlivu genotypu a linie na velikost snášky.

Konfidenční intervaly pro jednotlivé genotypy u všech linií se výraznou částí překrývají. Průměry hodnot leží prakticky ve stejné rovině. Genotypy nemají mezi liniemi průkazný vliv na počet snesených vajec.



**Obr. 8:** Graf vlivu genotypu a linie na hmotnost vajec.

Konfidenční intervaly pro jednotlivé genotypy u všech linií se výraznou částí překrývají. Průměry hodnot leží prakticky ve stejné rovině. Genotypy nemají mezi liniemi průkazný vliv na hmotnost snesených vajec.



## 4 ZÁVĚR

Analýza genu kuřecího růstového hormonu ve dvou liniích RIR a NH a jejich vzájemných kříženců odhalila tři cílová místa pro restriktázu *MspI*.

Na základě restriktčních vzorů byly identifikovány tři alely genu růstového hormonu. Z možných šesti genotypů byly nalezeny pouze čtyři. V linii RIR je nejvíce zastoupena alela  $A_1$  s frekvencí výskytu 0,925, u NH převažuje alela  $A_3$  s frekvencí výskytu 0,550. U finálních hybridů RIRxNH a NHxRIR převažují kříženci s alelou  $A_1$ . Nenalezení některých genotypů může být výsledkem selekce či malým počtem zkoumaných jedinců.

Ani jedna ze studovaných linií se nenachází v Hardy-Weinbergově rovnováze. Všechny linie jsou cíleně selektovány, a proto je uměle měněno zastoupení jednotlivých alel v populaci.

Nebyl nalezen žádný vztah mezi genotypy, alelami a vlastnostmi vaječné produkce.

V této práci lze dále pokračovat s rozšířením počtu studovaných jedinců. Silnějších výsledků lze dosáhnout sekvenací studovaného intronu 1. Dále je možné použití jiných restriktčních enzymů k nalezení dalších polymorfismů.

## **5 SEZNAM LITERATURY**

APA, R.; LANZONE, A.; MICELI, F. (1994): Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 160, 207-12.

BLALOCK, J.E. (1994): The syntax of immuno-neuroendocrine communication. *Immunology Today* 15, 504-11.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. (1980): Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *Amer. J. Hum. Genet.*, 32, 314-331.

BYATT, J.C.; STATEN, N.R.; SALSGIVER, W.J.; KOSTELEK, J.C.; COLLIER, R.J. (1993): Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *American Journal of Physiology*, 264, E986-92.

CRAWFORD, R.D. (1990): Poultry genetic resources: evolution, diversity, and conservation. *Poultry breeding and genetics* (Ed. Crawford, R.D.). Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam and New York, pp: 43-60.

FENG, X.P.; KUHNLEIN, U.; AGGREY, S.E.; GAVORA, J.S.; ZADWORNÝ, D.; (1997): Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. *Poult Sci* 76:1770–1775.

FLÉGR, J. (2005): *Evoluční biologie*. Academia, Praha, pp 559.

FOTOUHI, N.; KARATZAS, C.N.; KUHNLEIN, U.; ZADWORNÝ, D. (1993): Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens. *Theor Appl Genet* 85:931–936.

GODDART, A.D.; COVELLO, R.; LUOH, S.M.; ET, A.L. (1995) Mutation of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. *New England Journal of Medicine* 333, 1093-8.

- HARTL, D. L.; (2000): A Primer of Population Genetics, Third Edition. Harvard University. 180.
- IP, S.C.; ZHANG, X.; LEUNG, F.C. (2001): Genomic growth hormone gene polymorphism in native Chinese chicken. *Exp Biol Med* 226:458–462.
- KELLEY, S.M.; CELTEM, D.L. (1995): Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiological Reviews* 75, 77-106.
- KUHNLEIN, U.; LIU, N.; WEIGEND, S.; GAVORA J.S.; FAIRFULL, W.; ZADWORNÝ, D. (1997): DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Anim Genet* 28:116–123.
- MARSH, J.A. (1992) Neuroendocrine-immune interactions in the avian species – a review. *Poultry Science Reviews* 4, 129-67.
- MORENG, R.; AVENS, J.S. (1985): Classification, nomenclature, and showing of poultry. *Poultry science and production*. Reston publishing Co., Inc. Prentice-Hall Company. Reston, Virginia 22090, pp: 16-45.
- MOU, L.; LIU, N.; ZADWORNÝ, D.; CHALIFOUR, L.; KUHNLEIN, U. (1994): Presence of an additional PstI fragment in intron 1 of the chicken growth hormone encoding gene. *Gene* 160:313–314.
- NIE, Q.; IP, S.C.Y.; ZHANG, F. C.; LEUNG, G.; YANG, J. (2002): New Variations in Intron 4 of Growth Hormone Gene in Chinese Native Chickens *J. Hered.*, July 1; 93(4): 277 - 279.
- SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J. (2004): Genomes: Fowl sequence *Nature* 432, 679 - 680.
- TANAKA, M.; HOSOKAWA, Y.; WATAHIKI, M.; NAKASHIMA, K.; (1992): Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* 112:235–239.

THAKUR, M.S.; PARMAR, S.N.S.; TOJENKHOMBA, T.C.; SRIVASTAVA, P.N.; JOSHI, C.G.; RANK, D.N.; SOJANKI, J.V.; PILLAI, P.V. A. (2006): Growth hormone gene polymorphism in Kadaknath breed of poultry. Indian Journal of Biotechnology, 5. pp. 189-194.

VASAILATOS-YOUNKEN R. (1995): Proposed mechanisms for the regulation of growth hormone action in poultry: metabolic effects. Journal of Nutrition 125, 1783S-9S.

ZIMA, J.; MACHOLÁN, M.; MUNCLIGER, P.; PIÁLEK, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=378781#refseq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=378781#refseq)> PubMed(eng)

<<http://www.otvarena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf>>  
Otevřená věda(cze)